(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 362 139**

(21) Número de solicitud: 200930943

(51) Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)

C12N 5/071 (2000.01)

A61K 35/12 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **02.11.2009**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2011**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **29.06.2011**

(71) Solicitante/s: **Fundación FIBAO (Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental-Alejandro Otero)**
Avda. Fuerzas Armadas, 2
18014 Granada, ES
Universidad de Granada

(72) Inventor/es: **Garzón Bello, Ingrid Johanna;**
Muñoz Campos, Antonio;
González Andrades, Miguel;
Alaminos Mingorance, Miguel y
Muñoz Ávila, José Ignacio

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Elaboración de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina, agarosa y colágeno.**

(57) Resumen:

Elaboración de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina, agarosa y colágeno.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial que comprende: (a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a una muestra de células aisladas; (b) añadir un agente antifibrinolítico; (c) añadir al menos un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores; (d) añadir una composición de un polisacárido; (e) añadir una composición que comprende una proteína tipo colágeno; (f) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante del paso (e), y (g) inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (f). Así mismo, la presente invención se refiere al tejido artificial obtenible por dicho método, a su uso y a la composición farmacéutica que comprende dicho tejido.

ES 2 362 139 A1

DESCRIPCIÓN

Elaboración de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina, agarosa y colágeno.

La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina y, más específicamente, de la ingeniería tisular. Específicamente, se refiere a un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial, al tejido artificial obtenible por dicho método y al uso de este tejido artificial para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano dañado.

Estado de la técnica anterior

La ingeniería tisular constituye un conjunto de técnicas y disciplinas que permite diseñar y generar en laboratorio tejidos artificiales a partir de células madre procedentes de muestras tisulares obtenidas de biopsias y, por tanto, supone un enorme avance en el trasplante de órganos y en la medicina regenerativa. La ingeniería tisular es una de las áreas de la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos años, debido a su utilidad potencial para la fabricación *in vitro* de tejidos y órganos para su implante en pacientes necesitados de estos tejidos. No obstante, los tejidos artificiales descritos hasta la fecha presentan numerosos problemas y complicaciones; algunos de los cuales se exponen a continuación, empleando como ejemplo, los tejidos artificiales de piel, córnea, vejiga y uretra.

La vejiga urinaria es el órgano encargado de la recepción y el almacenamiento de la orina. Situada en el suelo pélvico, la vejiga urinaria se caracteriza por su capacidad y su distensibilidad, lo cual permite a ésta almacenar y retener la orina. La continencia es resultado de la contracción del esfínter urinario, que cierra la uretra y el cuello vesical evitando la salida de orina, así como de la relajación y distensión de la vejiga para almacenar la orina que se va acumulando en ella. Numerosas patologías congénitas o adquiridas pueden afectar a la integridad de la vejiga, alterando la función continente de ésta. Por un lado, las malformaciones de la vejiga suelen asociarse a defectos graves de la pared vesical que requieren reparación quirúrgica urgente. Por otro lado, los traumatismos pélvicos, el cáncer vesical y las lesiones traumáticas de la médula espinal constituyen patologías de gran frecuencia que requieren el uso de tejidos extravesicales para reparar la vejiga dañada. En este contexto, actualmente se llevan a cabo ampliaciones vesicales utilizando intestino (enterocistoplastia), estómago (gastrocistoplastia) o urotelio (ureterocistoplastia), siendo muy frecuentes las complicaciones asociadas a estas técnicas.

Hasta el momento, se han descrito muy pocos modelos de sustitutos de la vejiga urinaria que presenten utilidad clínica. Recientemente (Atala *et al*. Lancet. 2006 Apr 15;367(9518):1241-6), investigadores del Children's Hospital de Boston lograron implantar un sustituto de vejiga artificial generado a partir de colágeno y ácido poliglicólico en siete pacientes con daño vesical grave. Sin embargo, los modelos de vejiga artificial disponibles para el tratamiento de los pacientes necesitados de ello, son muy escasos y presentan multitud de inconvenientes, incluyendo la mala calidad y la escasa manipulabilidad de los tejidos generados. Además, el colágeno es un producto que tiende a la contracción y a la pérdida de volumen cuando se usa en ingeniería tisular, siendo escasa su consistencia y, por tanto, su manipulabilidad quirúrgica.

La uretra es el conducto por el que se elimina hacia el exterior la orina almacenada en la vejiga urinaria. Además de su función excretora en ambos sexos, la uretra cumple una función reproductiva en el hombre, a permitir el paso del contenido seminal desde las vesículas seminales durante la eyaculación. Son múltiples las afecciones congénitas (hipospadias y epispadias principalmente) o adquiridas (traumatismos, estenosis, etc.) que afectan a su integridad funcional y que precisan que sea sustituida en mayor o menor extensión, para conseguir restablecer su función normal (Baird *et al*. J Urol. 2005;174:1421-4; Persichetti *et al*. Plast Reconstr Surg. 2006;117:708-10).

Tradicionalmente, la reparación de tejidos lesionados se ha venido haciendo con elementos protésicos artificiales o tejidos tomados de una parte del propio paciente (autoinjerto o autotransplante) o de otro individuo (transplante heterólogo). Actualmente, para la corrección de la mayor parte de las patologías uretrales, se recurre a colgajos autólogos de tejidos adyacentes o a injertos libres, principalmente de mucosa oral o vesical. Sin embargo, la obtención de colgajos locales no siempre es factible, y la extracción de mucosa oral o vesical no está exenta de complicaciones y efectos secundarios tanto en la zona donante como en la zona receptora (Corvin *et al*. Urologe A. 2004;43(10):1213-6; Schultheiss *et al*. World J Urol. 2000;18:84-90). Por otro lado, la utilización de tejidos heterólogos ha arrojado resultados bastante pobres en la sustitución de uretra, siendo muy frecuente la aparición de rechazos inmunológicos del tejido trasplantado.

Hasta la fecha, se han descrito muy pocos modelos de sustitutos de uretra con probable utilidad clínica, siendo muy escasos los casos descritos en la literatura en los que un sustituto uretral ha sido implantado en pacientes. La mayoría de los modelos descritos hasta la fecha se basan en biomateriales de colágeno (De Filippo *et al*. J Urol. 2002 Oct;168 (4 Pt 2):1789-92; El-Kassaby *et al*. J Urol. 2003 Jan;169(1):170-3; discussion 173) o en piel del propio paciente (Lin *et al*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2005 Apr 20;85(15):1057-9). Sin embargo, todos estos modelos presentan numerosos problemas y complicaciones, y aún no se ha desarrollado ningún sustituto uretral exento de estos problemas. Por un lado, el colágeno es un producto que tiende a la contracción y a la pérdida de volumen cuando se usa en ingeniería tisular, siendo escasa su consistencia y, por tanto, su manipulabilidad quirúrgica. Por otro, el uso de piel autóloga aún no ha demostrado suficientemente su capacidad para adaptarse a las condiciones de la uretra, siendo muy difícil recelularizar fragmentos de dermis descelularizados.

La córnea es una estructura transparente y carente de vasos, a través de la cual la luz penetra en el ojo, constituyendo la principal barrera del globo ocular con el medio exterior. Por ese motivo, la integridad y el correcto funcionamiento de la misma son imprescindibles para una correcta función visual. La patología congénita o adquirida de la córnea constituye uno de los problemas más frecuentes en oftalmología, siendo numerosas las causas que provocan una alteración grave de la fisiología y la estructura corneal. En estos casos, suele ser necesario recurrir a tratamientos agresivos y no exentos de complicaciones, como son los implantes de membrana amniótica, los diferentes tipos de queratoprótesis e incluso el trasplante heterólogo de córnea (queratoplastia). Sin embargo, el trasplante corneal es una técnica altamente dependiente de la disponibilidad de córneas procedentes de donantes cadáveres, lo cual hace que un gran número de personas permanezcan en lista de espera para trasplante durante periodos de tiempo muy elevados. Por otro lado, es bien sabido que el trasplante de órganos procedentes de donante está sujeto a la posibilidad de rechazo inmunológico cuando estos órganos son implantados, obligando al paciente a someterse a terapia inmunosupresora durante toda su vida. Finalmente, el trasplante de cualquier tipo de órgano o tejido, incluida la córnea, es una técnica sujeta a la posibilidad de transmisión de todo tipo de enfermedades infecciosas desde el donante hasta el receptor, incluyendo VIH, hepatitis, herpes, enfermedades bacterianas y fúngicas, etc. Todos estos problemas y complicaciones derivadas del implante corneal, hacen necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas al trasplante heterólogo.

La fabricación en laboratorio de un sustituto corneal (constructo corneal o córnea artificial) es una de las áreas que está experimentando mayor auge dentro de la ingeniería tisular, siendo numerosos los laboratorios que actualmente están intentando sin demasiado éxito conseguir un sustituto corneal de calidad que pueda ser utilizado en la clínica humana o para la evaluación de productos farmacológicos y químicos (Griffith *et al*. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. Science. 1999;286(5447):2169-72; Orwin *et al*. Tissue Eng. 2000;6(4):307-19; Reichl *et al*. Int J Pharm. 2003;250:191-201). En tal sentido, se han desarrollado córneas artificiales de origen animal y humano. En ambos casos, los modelos desarrollados han utilizado biomateriales diversos como el colágeno tipo I, fibroína procedente de la seda (Higa y Shimazaki. Cornea. 2008 Sep;27 Suppl 1:S41-7), quitosán (Gao *et al*. J Mater Sci Mater Med. 2008 Dec;19(12):3611-9), ácido poliglicólico (Hu *et al*. Tissue Eng. 2005 Nov-Dec;11 (11-12):1710-7) y fibrina con agarosa (Alaminos *et al*. Invest Ophthalmol Vis Sci (IOVS). 2006; 47: 3311-3317; González-Andrades *et al*. J Tissue Eng Regen Med. 2009 May 5). De todos estos biomateriales, los mejores resultados obtenidos hasta ahora son los que tienen por base la fibrina y la agarosa. Las córneas de colágeno tipo I presentan tendencia a la pérdida de volumen y a la retracción de las mismas, con el inconveniente añadido del origen animal del colágeno utilizado. La fibroína y el quitosán son productos generados a partir de animales invertebrados, lo cual genera problemas significativos en relación con la biocompatibilidad. Las córneas de fibrina y agarosa desarrolladas, por el contrario, tienen la ventaja de que contienen fibrina procedente de la sangre del mismo paciente, mientras que la agarosa constituye un producto inerte desde el punto de vista inmunológico.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, y juega un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio interno, formando la principal barrera protectora del organismo frente a cualquier tipo de agresión externa. Existen numerosas patologías que afectan a la piel, destacando por su frecuencia las heridas, las úlceras por presión y las quemaduras. Los tratamientos actuales, basados en el uso de colgajos o injertos de piel o incluso en el implante de piel procedente de donante, están asociados a numerosos problemas.

La necesidad de solucionar estos problemas hace necesaria la búsqueda de alternativas basadas en la generación de productos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular (Horch *et al*. Burns. 2005 Aug;31 (5):597-602). En concreto, hasta el momento se han diseñado distintos tipos de piel artificial, incluyendo coberturas cutáneas sintéticas y biológicas, aunque ninguno de ellos ha logrado reproducir fielmente la estructura y las funciones de la piel humana nativa. Por un lado, las coberturas dérmicas sintéticas consisten en biomateriales no reabsorbibles y exentos de células vivas que se pueden utilizar como cubiertas temporales o como agentes inductores de la reparación tisular guiada. Estos tejidos artificiales e inertes poseen muy poca actividad biológica, por lo que no pueden ser empleados en lesiones profundas o extensas. Por otro lado, las coberturas biológicas consisten en la utilización de piel humana artificial en la que existen células vivas y matrices extracelulares que tratan de reproducir la estructura de la piel humana normal. Hasta el momento, la piel humana artificial que mejores resultados está ofreciendo es la piel artificial generada mediante ingeniería tisular a partir de células madre de la piel utilizando fibrina procedente del plasma humano como biomaterial (Meana *et al*. Burns 1998; 24: 621-630; Del Rio *et al*. Hum Gene Ther. 2002 May 20;13(8):959-68; Llames *et al*. Transplantation. 2004 Feb 15;77(3):350-5; Llames *et al*. Cell Tissue Bank 2006; 7: 4753.). Aunque estas técnicas supusieron un gran avance, su utilización clínica es limitada debido al hecho, fundamentalmente, de su escasa consistencia, su difícil manipulación y su enorme fragilidad. Uno de los sustitutos de tejido más consistentes es aquel que combina el uso de fibrina con la agarosa. Hasta el momento, la agarosa ha sido utilizada para la generación de sustitutos del cartílago (Miyata *et al*. J Biomech Eng. 2008 0ct;130(5):051016), la córnea (Alaminos *et al*. Invest Ophthalmol Vis Sci (IOVS). 2006; 47: 3311-3317) y la mucosa oral humana (Alaminos *et al*. J Tissue Eng Regen Med. 2007 Sep-Oct;1 (5):350-9; Sánchez-Quevedo *et al*. Histol Histopathol. 2007 Jun;22(6):631-40), pero no existe experiencia previa en el uso de este biomaterial para la fabricación de piel artificial.

La ingeniería tisular es una de las áreas que está experimentando mayor auge dentro de la biotecnología. Sin embargo, las desventajas de los tejidos artificiales hasta ahora existentes hacen necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la obtención de tejidos artificiales que puedan ser utilizados en la clínica humana o para la evaluación de productos farmacológicos y químicos, superando las limitaciones hasta ahora detectadas.

Explicación de la invención

La ingeniería tisular es una de las áreas de la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos años, debido a su utilidad para la fabricación *in vitro* de tejidos y órganos para su implante en pacientes necesitados de estos tejidos Sin embargo, las limitaciones de los tejidos artificiales hasta ahora existentes hacen necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la obtención de tejidos artificiales que puedan ser utilizados en la clínica humana o para la evaluación de productos farmacológicos y químicos.

La presente invención proporciona un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial, al tejido artificial obtenible por dicho método y al uso de este tejido artificial para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano dañado.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial (de aquí en adelante, método de la invención) que comprende:

a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a células aisladas,

b) añadir un agente antifibrinolítico al producto resultante del paso (a),

c) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante del paso (b),

d) añadir una composición que comprende un polisacárido al producto resultante del paso (c),

e) añadir una composición que comprende una proteína al producto resultante del paso (d),

f) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante del paso (e), y

g) inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (f).

En el paso (a) del método de la invención se añade una composición que comprende fibrinógeno a células aisladas, preferiblemente, de un mamífero. Dichas células pueden obtenerse mediante diferentes procedimientos descritos en el estado de la técnica, que pueden depender del tipo celular particular del que se trate. Algunos de estos procedimientos son, por ejemplo, pero sin limitarse, biopsia, procesado mecánico, tratamiento enzimático (por ejemplo, pero sin limitarse, con tripsina o colagenasa de tipo I), centrifugación, lisis eritrocitaria, filtración, cultivo en soportes o medios que favorezcan la proliferación selectiva de dicho tipo celular o inmunocitometría. Algunos de estos procedimientos se describen en detalle en los Ejemplos de esta memoria.

Las células del paso (a) pueden ser células diferenciadas como, por ejemplo, pero sin limitarse, fibroblastos, queratocitos o células musculares lisas, o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en dichas células como, por ejemplo, células madre adultas.

En una realización preferida del método de la invención, las células del paso (a) son fibroblastos o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en fibroblastos. Los fibroblastos pueden obtenerse a partir de cualquier tejido u órgano, sin embargo, preferiblemente, los fibroblastos del paso (a) proceden del tejido o del órgano en el que va a emplearse como sustituto el tejido artificial. Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, los fibroblastos proceden, preferiblemente, de piel (fibroblásticos dérmicos); cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, los fibroblastos proceden, preferiblemente, de vejiga; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial los fibroblastos proceden, preferiblemente, de uretra; o cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de mucosa oral o una mucosa oral artificial los fibroblastos proceden preferiblemente, de mucosa oral. No obstante, los fibroblastos pueden obtenerse a partir de cualquier otro tejido u órgano, como por ejemplo, la mucosa oral, la pared abdominal o cualquier tejido conjuntivo. Por ejemplo, los fibroblastos obtenidos a partir de mucosa oral pueden emplearse para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, o un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial.

En otra realización preferida del método de la invención, las células del paso (a) son queratocitos o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en queratocitos. Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, preferiblemente, se emplean queratocitos del estroma corneal.

La posibilidad de que todos los componentes del tejido artificial sean de origen autólogo permite que el transplante de dicho tejido pueda realizarse sin que sea necesaria la inmunosupresión del sujeto transplantado. Sin embargo, los componentes del tejido artificial también puedan ser de origen alogénico, es decir, pueden proceder de un individuo diferente a aquel al que se le va a transplantar el tejido artificial. Incluso la especie de la cual proceden dichos componentes, puede ser diferente; en cuyo caso se dice que su origen es xenogénico. Esto abre la posibilidad de que el tejido artificial esté preparado de antemano cuando se necesite con urgencia, aunque en este caso sí sería recomendable proceder a la inmunosupresión del sujeto al que se transplante el tejido artificial.

Por lo tanto, en una realización preferida, las células del paso (a) de la invención son de origen autólogo. No obstante, las células del paso (a) también pueden ser de origen alogénico o xenogénico.

Mediante la adición a las células del paso (a) de los diferentes componentes descritos en los pasos (a)-(e) del método de la invención, y tras dejar reposar el producto resultante del paso (e) en un soporte, se produce la formación de una matriz que comprende fibrina, el polisacárido y la proteína añadida en el paso (e), en la que quedan embebidas dichas células y sobre la cual y/o en cuyo interior éstas pueden crecer. Preferiblemente, las células del paso (a) crecen en el interior de dicha matriz.

La formación de una matriz de fibrina tiene lugar por la polimerización del fibrinógeno inducida por trombina. El fibrinógeno es una proteína de elevado peso molecular que se encuentra presente en el plasma sanguíneo. La trombina es una enzima proteolítica que provoca la ruptura de la molécula de fibrinógeno en polipéptidos de bajo peso molecular y en monómeros de fibrina. Dichos monómeros polimerizan en dímeros y posteriormente se unen entre sí mediante enlaces covalentes, por acción del factor XIII, previamente activado por la trombina, y en presencia de iones de calcio.

La composición que comprende fibrinógeno del paso (a) puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, plasma sanguíneo. La composición del paso (a) puede asimismo prepararse a partir de un derivado plasmático, como, por ejemplo, pero sin limitarse un crioprecipitado o un concentrado de fibrinógeno. Además de fibrinógeno, la composición del paso (a) puede contener otros factores de coagulación.

En una realización preferida, la concentración de fibrinógeno en el producto resultante del paso (e) es de entre 0,5 y 10 g/L. En una realización más preferida, la concentración en el producto resultante del paso (e) es de entre 1 y 4 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

En una realización preferida, el fibrinógeno de la composición del paso (a) o la composición que comprende fibrinógeno del paso (a) es de origen autólogo. No obstante, el fibrinógeno de la composición del paso (a) o la composición que comprende fibrinógeno del paso (a) también puede ser de origen alogénico o xenogénico.

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la composición que contiene fibrinógeno del paso (a) es plasma sanguíneo. En este caso, la polimerización del fibrinógeno puede inducirse mediante la adición en el paso (c) de una fuente de calcio.

En una realización más preferida de este primer aspecto de la invención, la fuente de calcio del paso (c) es una sal de calcio como, por ejemplo, pero sin limitarse, cloruro cálcico, gluconato cálcico o una combinación de ambas. La concentración de la sal de calcio deberá ser suficiente para inducir la polimerización del fibrinógeno. En una realización más preferida, la sal de calcio es cloruro cálcico. En una realización aún más preferida, la concentración de cloruro de calcio en el producto resultante del paso (e) es de entre 0,25 y 3 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

El término “factor de coagulación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un componente, generalmente, una proteína, presente en el plasma sanguíneo y que interviene en la reacción en cadena que hace posible la coagulación. Son trece los factores de coagulación, nombrados con números romanos: I: fibrinógeno; II: protrombina; III: factor tisular o tromboplastina; IV: calcio; V: proacelerina; VI: factor inactivo o cimógeno; VII: proconvertina; VIII: factor antihemofílico A o factor von Willebrand; IX: factor antihemofílico B o factor de Christmas; X: factor de Stuart-Prower; XI: factor antihemofílico C; XII: Factor Hageman; XIII: Factor estabilizante de la fibrina; XIV: Fitzgerald; XV: Fletcher; XVI: plaquetas; y XVII: Somocurcio. Preferiblemente, el otro factor de coagulación añadido en el paso (c) del método de la presente invención es el factor XIII.

El polímero de fibrina puede degradarse mediante el proceso denominado fibrinólisis. Durante la fibrinólisis, el plasminógeno es convertido en la enzima activa plasmina, por el activador tisular del plasminógeno; la plasmina se une a la superficie de la fibrina a través de sus sitios de unión, para producir la degradación del polímero de fibrina. Para evitar la fibrinólisis de la matriz de fibrina, en el paso (b) de la presente invención se añade un agente antifibrinolítico como, por ejemplo, pero sin limitarse, ácido épsilon aminocaproico, ácido tranexámico o aprotinina.

El ácido tranexámico es un producto sintético derivado del aminoácido lisina con gran afinidad por los sitios de unión de lisina del plasminógeno; bloquea estos sitios y previene la unión del plasminógeno activado a la superficie de fibrina, ejerciendo un efecto antifibrinolítico. El ácido tranexámico tiene la ventaja, frente a otros agentes antifibrinolíticos de origen animal, de que no transmite enfermedades. Por tanto, en una realización preferida, el agente antifibrinolítico es el ácido tranexámico. En una realización aún más preferida, la concentración de ácido tranexámico en el producto resultante del paso (e) es de entre 0,5 y 2 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

Las matrices de fibrina son muy versátiles, por lo que se han empleado para la elaboración de diferentes tejidos artificiales, sin embargo, la utilización clínica de las mismas se ha visto limitada debido al hecho, fundamentalmente, de su escasa consistencia, su difícil manipulación y su enorme fragilidad. Por ese motivo, en el paso (d) del método de la invención se añade un polisacárido. En general, dicho polisacárido se emplea para aportar resistencia y consistencia al tejido, y es conveniente que sea soluble en el mismo. Ejemplos de polisacáridos que pueden emplearse en el paso (d) del método de la presente invención son pero, sin limitarse, agar-agar, agarosa, alginato, quitosano o carragenatos, o cualquier combinación de los anteriores.

La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de algas de géneros como *Gellidium* o *Gracillaria*. La agarosa, frente a otros polisacáridos que pueden ser empleados en el paso (d) de la presente invención, tiene la ventaja de que forma una matriz inerte desde el punto de vista inmunológico. Por tanto, en una realización preferida, el polisacárido del paso (d) del método de la invención es agarosa. Existen diferentes tipos de agarosa que varían en sus propiedades físicas y químicas como, por ejemplo, la temperatura de gelificación, la fuerza del gel y/o la porosidad. Preferiblemente, la agarosa del paso (d) del método de la invención es una agarosa con un punto de fusión bajo, es decir, una agarosa que se repolimerice y solidifique a una temperatura, preferiblemente, menor de 65ºC y, más preferiblemente, menor de 40ºC; de esta manera puede emplearse para preparar el tejido a temperaturas muy bajas, minimizando la probabilidad de muerte celular. En una realización más preferida, la agarosa empleada en el paso (d) del método de la invención es de tipo VII. En una realización aún más preferida, la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, en el producto resultante del paso (e) está a una concentración, ventajosamente, de entre 0,1 y 6 g/L, preferiblemente, de entre 0,15 y 3 g/L, y más preferiblemente, de entre 0,25 y 2 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

El paso (e) del método de la invención comprende la adición de una composición que comprende una proteína al producto resultante del paso (d). Ejemplos de proteínas que pueden emplearse en el paso (e) del método de la presente invención son pero, sin limitarse, colágeno, reticulina o elastina. Estas proteínas forman parte de la matriz extracelular del tejido conjuntivo de manera natural en los tejidos, por lo que las células embebidas en un tejido artificial obtenido mediante el método de la invención, encuentran un micro-ambiente más parecido al fisiológico, mejorando la adhesión, la diferenciación y/o la supervivencia de dichas células.

Además, la adición de dichas proteínas en el paso (e) del método de la invención mejora las propiedades físicas (reológicas, mecánicas o biomecánicas) del tejido artificial obtenido. En los ejemplos de esta memoria se demuestra que en tejidos artificiales que comprenden fibrina, agarosa y colágeno, empleando concentraciones crecientes de colágeno mejora el comportamiento viscoelástico, lo que se pone de manifiesto por un aumento del esfuerzo umbral dependiente de la concentración de colágeno.

Las principales propiedades reológicas de un material sólido o semisólido son la viscosidad y la elasticidad. La viscosidad es la resistencia que ofrece un fluido a la deformación tangencial, y sería equivalente a la consistencia o la rigidez. La elasticidad es la propiedad mecánica de ciertos materiales de sufrir deformaciones reversibles cuando se encuentran sujetos a la acción de fuerzas exteriores, y de recuperar la forma original cuando cesan estas fuerzas exteriores. El análisis de estos parámetros se realiza mediante reometría, técnica física que utiliza instrumentos denominados reómetros.

El esfuerzo umbral es la energía necesaria para provocar una deformación irreversible en un sólido o un fluido. Normalmente, todos los materiales presentan una región elástica, en la que el esfuerzo aplicado provoca una deformación totalmente reversible cuando cesa el esfuerzo. Si ese esfuerzo supera un límite (módulo elástico), la deformación pasa a ser irreversible, entrando en una región plástica. Finalmente, si el esfuerzo supera el módulo plástico, el material se rompe (punto de fractura).

El problema principal de los biomateriales clásicos es la falta de consistencia: estos biomateriales se parecen más a un gel que a un tejido sólido, dificultando notablemente su aplicación clínica. Los tejidos artificiales obtenidos mediante el método de la invención son más resistentes, consistentes, rígidos, elásticos y, en suma, manejables y manipulables quirúrgicamente, pudiendo incluso suturarse.

El colágeno es una proteína de fácil disponibilidad en la naturaleza y que biológicamente se caracteriza por su baja inmunicidad y elevada actividad tisular. El colágeno forma las fibras colágenas, que son flexibles, pero ofrecen gran resistencia a la tracción. En la presente invención se demuestra que los tejidos artificiales de fibrina, agarosa y colágeno presentan una mayor densidad fibrilar a nivel del estroma, un mejor comportamiento viscolástico y un esfuerzo umbral creciente según se aumenta la concentración de colágeno, y más elevado que los tejidos artificiales de colágeno. Por tanto, en una realización preferida la proteína añadida en el paso (e) es colágeno.

En una realización preferida, el colágeno añadido en el paso (e) se selecciona de la lista que comprende: colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno tipo V, colágeno tipo VI, colágeno tipo VII, colágeno tipo VIII, colágeno tipo IX, colágeno tipo X, colágeno tipo XI, colágeno tipo XII, colágeno tipo XIII o cualquier combinación de los anteriores. En una realización más preferida, el colágeno añadido en el paso (e) se selecciona de la lista que comprende: colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno tipo V, colágeno tipo IX o cualquier combinación de los anteriores. La selección de un tipo particular de colágeno en el paso (e) del método de la invención depende del tejido artificial que se desee preparar y se realiza en función de las características de cada colágeno que son conocidas en el estado de la técnica.

Por ejemplo, la función principal del colágeno tipo I es la de resistencia al estiramiento, y se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón y la córnea. Así, en la presente invención se demuestra que la adición de colágeno tipo I en el paso (e) otorga excelentes propiedades al tejido artificial cuando se quiere preparar, por ejemplo, pero sin limitarnos un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial. Por tanto, en una realización preferida el colágeno es colágeno tipo I.

En una realización aún más preferida, el colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, en el producto resultante del paso (e) está a una concentración, ventajosamente, de entre 0,5 y 5 g/L, preferiblemente, de entre 1,8 y 3,7 g/L, y más preferiblemente, de entre 2,5 y 3 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

En una realización particular, el colágeno utilizado es un atelocolágeno, es decir un colágeno del cual se han eliminado las regiones terminales de estructura no helicoidal denominadas telopéptidos. Estos telopéptidos pueden hacer que el colágeno que sea insoluble y son portadores de los principales determinantes antigénicos del colágeno. El atelocolágeno se obtiene, por ejemplo, mediante tratamiento proteásico con pepsina.

En una realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L, y la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En una realización preferida, el método de la invención además de los pasos (a)-(g) descritos comprende un paso adicional entre el paso (b) y el paso (c) en el que se añade una proteína. Ejemplos de proteínas que pueden emplearse en el paso (d) del método de la presente invención son pero, sin limitarse, fibronectina, laminina, colágeno tipo VII o entactina, o cualquier combinación de los anteriores. La adición de estas proteínas entre el paso (b) y el paso (c) favorece la adhesión de las células del paso (f) al producto resultante del paso (e).

La fibronectina es una glicoproteína presente en la matriz extracelular (MEC) de la mayoría de los tejidos celulares animales desempeñando un importante papel en la adhesión de las células a la matriz. En una realización más preferida, la proteína añadida entre el paso (b) y el paso (c) del método de la invención es fibronectina. El objeto de esta adición es la de favorecer la adhesión de las células del paso (f) al producto resultante del paso (e). Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, la adición de fibronectina minimiza el desprendimiento de las células del epitelio corneal añadidas en el paso (f), lo que supone una importante ventaja con respecto a otros métodos descritos en el estado de la técnica. En una realización aún más preferida, la concentración de fibronectina en el producto resultante del paso (e) es de entre 0,25 y 1 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

Una vez realizados los pasos (a)-(e) del método de la invención, el producto resultante del paso (e) se deja reposar en un soporte para que se produzca la formación de la matriz que comprende la fibrina, el polisacárido y la proteína añadida en el paso (e), y que tiene embebidas las células del paso (a). Soportes que pueden ser empleados son, por ejemplo, pero sin limitarse, placas de cultivo tisular o insertos porosos de cultivo celular. Preferiblemente, dichos soportes estarán en condiciones de esterilidad.

El paso (f) del método de la invención consiste en cultivar células aisladas, preferiblemente, de un mamífero, en o sobre el producto resultante del paso (e). Dichas células pueden obtenerse mediante diferentes procedimientos descritos en el estado de la técnica y que pueden depender del tipo celular particular del que se trate. Algunos de estos procedimientos son, por ejemplo, pero sin limitarse, biopsia, procesado mecánico, tratamiento enzimático (por ejemplo, pero sin limitarse, con tripsina o colagenasa de tipo I), centrifugación, lisis eritrocitaria, filtración, cultivo en soportes o medios que favorezcan la proliferación selectiva de dicho tipo celular o inmunocitometría. Algunos de estos procedimientos se describen en detalle en los Ejemplos de esta solicitud de patente.

Las células del paso (f) pueden ser células diferenciadas como, por ejemplo, pero sin limitarse, células epiteliales, o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en dichas células como, por ejemplo, células madre adultas.

En una realización preferida, las células diferenciadas del paso (f) son células epiteliales, como, por ejemplo, pero sin limitarse, queratinocitos, células del epitelio de la mucosa oral, células del epitelio de la vejiga, células del epitelio de la uretra, células del epitelio corneal o células endoteliales vasculares.

Preferiblemente, los células epiteliales del paso (f) proceden del tejido o del órgano en el que va a emplearse como sustituto el tejido artificial. Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, las células epiteliales proceden, preferiblemente, de la epidermis de la piel, es decir, son queratinocitos; cuando se emplea para preparar una tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, las células epiteliales proceden, preferiblemente, del epitelio de la vejiga o urotelio; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial las células epiteliales proceden, preferiblemente, del epitelio de la uretra; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial preferiblemente, las células epiteliales son células del epitelio corneal; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de mucosa oral, preferiblemente, las células epiteliales proceden, preferiblemente, del epitelio de la mucosa oral.

Sin embargo, las células epiteliales del paso (f) también pueden obtenerse a partir de un tejido u órgano distinto del tejido o del órgano en el que va a emplearse como sustituto el tejido artificial. Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, o un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial las células epiteliales del paso (f) pueden ser células del epitelio de la mucosa oral. O, por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, o cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, las células epiteliales pueden ser queratinocitos.

Uno de los problemas que se asocian a la generación de tejido artificial en laboratorio es la obtención de un número significativo de células diferenciadas, por lo que con frecuencia, se considera como una fuente alternativa el uso de células madre, con capacidad para diferenciarse a dichas células. Se entiende por "célula madre" aquella que tiene una elevada capacidad para dividirse y diferenciarse morfológica y funcionalmente en distintos tipos de células más especializadas. Durante el proceso de diferenciación, una célula indiferenciada modifica su fenotipo y morfología para convertirse en una célula diferenciada, con una estructura y función especializada.

Las células madre se pueden clasificar atendiendo a su potencialidad, es decir, a su capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares en: (a) totipotenciales: capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario como en tejido extraembrionario; (b) pluripotenciales con capacidad para diferenciarse a cualquiera de los tejidos procedentes de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo); (c) multipotenciales: capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares derivados de una misma capa embrionaria (endodermo, mesodermo o ectodermo); y (d) unipotenciales: capacidad para formar un único linaje celular.

Según su origen, las células madre se han dividido en: (a) embrionarias: de la masa celular interna del blastocisto en el estadio del embrión preimplantatorio o de la cresta gonadal, y que son totipotenciales o pluripotenciales; y (b) adultas: en el adulto, el feto y el cordón umbilical, y que son multipotenciales o unipotenciales. Dentro de las células madre adultas, nos encontramos con las células madre mesenquimales, que se encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos, como, por ejemplo, pero sin limitarse, la médula ósea, la sangre periférica, el tejido adiposo o el cordón umbilical. En una realización preferida, las células madre adultas son células madre adultas de la médula ósea, del tejido adiposo o del cordón umbilical.

El cordón umbilical constituye una interesante fuente de células madre adultas, debido a que, a diferencia de las células madre adultas obtenidas de otras fuentes; (a) su método de obtención no es invasivo ni doloroso; y (b) su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación no disminuye como consecuencia del proceso de envejecimiento. Entre las diferentes fuentes de células madre del cordón umbilical destacan las llamadas células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, por: (a) su gran capacidad de proliferación y a su rapidez de expansión en cultivo; y (b) la baja expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I y ausencia de expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II, lo que las convierte en buenas candidatas para la terapia celular alogénica.

Por tanto, en otra realización preferida, las células del paso (f) son células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Estas células expresan en su superficie diversos marcadores característicos de las células mesenquimales como, por ejemplo, SH2, SH3, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105 o CD166, y son negativos para marcadores del linaje hematopoyético, como por ejemplo, CD31, CD34, CD38, CD40 o CD45. Las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical pueden diferenciarse, por ejemplo, a condroblastos, osteoblastos, adipocitos, precursores neurales, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células endoteliales o hepatocitos.

Las células madre adultas pueden ser caracterizadas mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de su estado indiferenciado, mediante diferentes procedimientos que son conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en *microarrays*, estudios proteómicos o análisis por *differential display*.

Las células madre pueden ser inducidas a diferenciarse *in vitro* para dar lugar a células que expresen, al menos, una o más características propias de células diferenciadas. Ejemplos de células diferenciadas a las que pueden diferenciarse las células madre, pero sin limitarse, son fibroblasto, queratinocito, célula del urotelio, célula del epitelio de la uretra, célula del epitelio corneal, célula del epitelio de la mucosa oral, condroblasto, osteoblasto, adipocito o neurona. En una realización preferida de la invención, la célula diferenciada a partir de la célula madre multipotente de la invención expresa una o más características propias de una célula diferenciada seleccionada de la lista que comprende: fibroblasto, queratinocito, célula del urotelio, célula del epitelio de la uretra, célula del epitelio corneal, célula del epitelio de la mucosa oral, condroblasto, osteoblasto, adipocito o neurona.

Las células diferenciadas pueden ser caracterizadas mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de su estado diferenciado, mediante diferentes procedimientos que son conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en *microarrays*, estudios proteómicos o análisis por *differential display*.

En una realización preferida, las células del paso (f) de la invención son de origen autólogo. No obstante, las células del paso (f) también pueden ser de origen alogénico o xenogénico.

Sobre el producto resultante del paso (e) y/o en su interior las células del paso (f) son capaces de proliferar. Preferiblemente, las células del paso (f) proliferan sobre la superficie del producto resultante del paso (e).

Las células del paso (f) se dejan proliferar hasta que alcanzan un número adecuado hasta que alcanzan, típicamente, al menos, un 70% de confluencia, ventajosamente, al menos, un 80% de confluencia, preferiblemente, al menos, un 90% de confluencia, más preferiblemente, al menos, un 95% de confluencia y, aún más preferiblemente, al menos,

un 100% de confluencia. Durante el tiempo que las células se mantienen en cultivo, el medio de cultivo en el que se encuentran puede ser parcial o totalmente reemplazado por medio nuevo para reemplazar ingredientes agotados y eliminar metabolitos y catabolitos potencialmente dañinos.

Para la correcta diferenciación de algunos tipos celulares puede ser necesario un paso adicional. Por ejemplo, en el caso de las células del epitelio de la mucosa oral, los queratinocitos o las células del epitelio corneal, puede ser necesario exponer la superficie epitelial al aire para promover la correcta estratificación y maduración del epitelio manteniendo la matriz que comprende las células del paso (a) sumergida en medio de cultivo (técnica aire líquido).

Por tanto, en una realización preferida, el método de la invención, además de los pasos (a)-(g) descritos anteriormente comprende un paso adicional en el que el producto resultante del paso (f) se expone al aire. En general, el método de la invención incluye este paso cuando se emplea para obtener un tejido artificial que sirva para reemplazar a un tejido natural cuyo epitelio se encuentra expuesto normalmente al contacto con el aire como, por ejemplo, pero sin limitarnos, la piel, la córnea, la mucosa oral, la uretra o la vagina. Preferiblemente, este paso se realiza cuando se prepara un tejido sustituto de piel o una piel artificial, o cuando se prepara un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, o cuando se prepara un tejido sustituto de mucosa oral o una mucosa oral artificial.

Una de las innovaciones más importantes del método de la invención consiste en la existencia de un paso (g) en el que se induce la nanoestructuración del producto resultante del paso (f). La expresión “nanoestructuración”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una modificación estructural consistente en la generación de enlaces de tamaño inferior a una micra entre las fibras de fibrina y entre éstas y las moléculas de agarosa.

En una realización preferida, la inducción de la nanoestructuración del paso (g) comprende la deshidratación y/o la compresión mecánica del producto resultante del paso (f). El objetivo del paso (g) es generar una modificación estructural entre las fibras de fibrina y las moléculas de agarosa del tejido artificial para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad, que no se obtienen mediante otros métodos descritos en el estado de la técnica. El resultado final es una modificación irreversible de las fibras que genera unas cualidades biomecánicas muy favorables para la manipulación quirúrgica y el implante clínico.

El término “deshidratación” se refiere a una eliminación parcial y/o total del fluido intersticial del producto resultante del paso (f). Por ejemplo, la cantidad de fluido intersticial eliminado del producto resultante del paso (f) puede ser de, al menos, un 50%, al menos, un 60%, al menos, un 70%, al menos, un 80%, al menos, un 90% o, al menos, un 99% del fluido intersticial contenido originalmente en el producto resultante del paso (f).

La deshidratación del producto resultante del paso (f) puede conseguirse por medio de cualquier procedimiento físico o químico. En una realización preferida, la deshidratación del producto resultante del paso (f) comprende un procedimiento seleccionado de la lista que comprende: drenaje, evaporación, succión, presión capilar, ósmosis o electro-ósmosis.

El líquido intersticial puede ser eliminado mediante la inclinación del producto resultante del paso (f); el líquido intersticial es entonces drenado debido al efecto de la gravedad y el gradiente.

El líquido puede ser eliminado mediante succión, Por ejemplo, aplicando vacío mediante una bomba mecánica a la superficie donde se encuentra el producto resultante del paso (f).

El líquido intersticial puede ser eliminado mediante evaporación, por ejemplo, incubando el producto resultante del paso (f) en condiciones que promueven la evaporación, por ejemplo, a una presión menor que la presión atmosférica y/o a una temperatura mayor que la temperatura ambiente.

El líquido intersticial también puede ser eliminado empleando un agente osmótico con tendencia a absorber agua como, por ejemplo, pero sin limitarse, una solución de cloruro sódico hiperosmolar, separando al producto resultante del paso (f) de esta solución mediante una membrana semipermeable, una esponja u otro material secante.

En una realización preferida, el líquido intersticial puede ser eliminado mediante presión capilar, por ejemplo, mediante la aplicación de un material absorbente al producto resultante del paso (f). Algunos ejemplos de material absorbente que podrían ser empleados en el paso (g) de la invención, pero sin limitarse, son papel de filtro, papel 3M de la casa comercial Whatman, fibra de celulosa, o tela absorbente. Preferiblemente, el material absorbente estará esterilizado.

El tiempo requerido para la deshidratación dependerá del procedimiento o procedimientos empleados, y puede ser determinado con facilidad por un experto en la materia. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de un determinado procedimiento de deshidratación durante un determinado periodo de tiempo puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria.

El líquido intersticial también puede ser eliminado mediante la compresión mecánica del producto resultante del paso (f). La compresión mecánica del producto resultante del paso (f) además puede servir para dar al producto resultante del paso (f) una forma definida deseada.

La compresión del producto resultante del paso (f) puede realizarse mediante cualquier procedimiento descrito en el estado de la técnica. Puede emplearse un procedimiento de compresión "estático", donde el producto resultante del paso (f) permanece estacionario como, por ejemplo, pero sin limitarse, la aplicación de una carga estática (por ejemplo, un peso muerto), un hidráulico o una leva. También puede emplearse un procedimiento de compresión "dinámico", donde el producto resultante del paso (f) se mueve durante la compresión como, por ejemplo, mediante la aplicación de uno o más rodillos o mediante la extrusión a través de un orificio constrictor.

La compresión mecánica del producto resultante del paso (f) puede realizarse mediante extrusión, por ejemplo, mediante el paso del producto resultante del paso (f) a través de un orificio que lo constriña, por ejemplo, una cámara cónica. La cámara cónica puede tener paredes porosas, de manera que permitiría la eliminación del fluido intersticial del producto resultante del paso (f) mientras éste pasa a su través.

La compresión del producto resultante del paso (f) puede realizarse mediante la centrifugación del producto resultante del paso (f). Por ejemplo, el producto resultante del paso (f) puede colocarse sobre un tubo con el fondo poroso, de manera que, además de la compresión mecánica, se produciría la eliminación del líquido intersticial del producto resultante del paso (f).

La compresión del producto resultante del paso (f) puede realizarse mediante la aplicación de un globo en su interior para comprimir el producto resultante del paso (f) contra una superficie sólida. La superficie sólida puede, por ejemplo, formar un tubo alrededor del producto resultante del paso (f), permitiendo la formación de un tejido artificial tubular.

En una realización preferida, la compresión del producto resultante del paso (f) comprende la aplicación de un peso encima del producto resultante del paso (f), de manera que se ejerce una acción mecánica de presión sobre el tejido. Resulta evidente que cuanto mayor sea el peso menor será el tiempo necesario para obtener un tejido artificial con las características apropiadas. El peso empleado para la compresión puede tener una superficie plana o puede colocarse sobre un material que tenga una superficie plana, por ejemplo, plástico, cerámica, metal o madera.

En la figura 1 de la presente memoria se muestra un esquema no limitativo de cómo puede realizarse la nanoestructuración del producto resultante del paso (f) mediante su deshidratación y compresión. En dicho esquema puede observarse como la nanoestructuración puede obtenerse situando el producto resultante del paso (f) entre dos papeles de filtro estéril, y colocando sobre el mismo un peso de aproximadamente 250 g (equivalente a aproximadamente 2.000 N/m^2) sobre una superficie plana de vidrio estéril durante aproximadamente 10 minutos; entre el tejido y el papel de filtro sobre el que se coloca el peso se puede disponer un material poroso para evitar que el producto resultante del paso (f) se adhiera al papel de filtro. El material empleado para evitar la adherencia debe ser poroso para permitir la salida de agua desde el tejido hacia el agente deshidratante: dicho material poroso empleado para evitar la adherencia puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una membrana de policarbonato, nylon, vidrio, cerámica o metal perforado.

En una realización preferida, la compresión del producto resultante del paso (f) comprende la aplicación de una presión sobre el mismo. Preferiblemente, la magnitud de la presión es de entre 1.000 y 5.000 N/m^2, más preferiblemente, de entre 1.500 y 2.500 N/m^2 y, aún más preferiblemente, de aproximadamente 2.000 N/m^2. La aplicación de dicha presión puede hacerse manual, automática o semi-automáticamente. El tiempo que se necesita ejercer la presión depende de la magnitud de la presión aplicada y puede ser determinado con facilidad por un experto en la materia. Resulta evidente que cuanto mayor sea la presión menor será el tiempo necesario para obtener un tejido artificial con las características apropiadas. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de una determinada magnitud de presión durante un determinado periodo de tiempo puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria.

Para inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (f) pueden emplearse uno o más procedimientos, de manera secuencial o simultánea. El tiempo requerido para la nanoestructuración puede ser menor de 12 horas, menor de 6 horas, menor de 3 horas, menor de 1 hora, menor de 30 minutos, menor de 10 minutos, menor de 2 minutos o menor de 1 minuto. El tiempo requerido para la nanoestructuración dependerá del procedimiento o procedimientos empleados, y puede ser determinado con facilidad por un experto en la materia. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de un determinado procedimiento durante un determinado periodo de tiempo puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria.

Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere a un tejido artificial obtenible por el método de la invención anteriormente descrito (de ahora en adelante, tejido artificial de la invención).

En una realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de piel o una piel artificial.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, es un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial.

El tejido artificial obtenible por el método de la invención se puede cortar en el tamaño deseado y/o disponer en una conformación adecuada para su uso.

Previamente a su uso, puede evaluarse la idoneidad del tejido artificial de la invención para ejercer su función, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante cualquiera de los procedimientos descritos en los ejemplos de la presente descripción.

Los fármacos y productos químicos deben ser evaluados antes de su comercialización en animales de experimentación. A este respecto, son varios los informes y directivas aprobados por la Unión Europea que tratan de restringir o incluso prohibir la experimentación con animales en el sector de los productos cosméticos (Directiva 76/768/CEE del Consejo Europeo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros en materia de productos cosméticos), y es de esperar que la prohibición total sea efectiva durante los próximos años. La Unión Europea apoya todas las medidas cuyo objetivo principal sea el bienestar de los animales utilizados con fines experimentales y para lograr métodos científicos de sustitución para reducir al mínimo el número de animales utilizados en experimentación (Decisión 1999/575/CE del Consejo, de 23 de marzo de 1998, relativa a la celebración por la Comunidad del Convenio Europeo sobre la protección de los animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos-Diario Oficial L 222 de 24.08.1999).

Por tanto, un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la evaluación de un producto farmacológico y/o químico.

Una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico, o una interrupción del flujo sanguíneo, pueden dar lugar a una pérdida de células de un tejido o un órgano. Esta pérdida celular conllevaría una alteración de la función normal de dicho tejido u órgano; y por consiguiente, conduciría al desarrollo de enfermedades o secuelas físicas que merman la calidad de vida de la persona. Por tanto, es importante tratar de regenerar o y restablecer la función normal de dichos tejidos u órganos. El tejido o el órgano dañado pueden ser sustituidos por un tejido u órgano nuevo que haya sido fabricado en el laboratorio mediante técnicas de ingeniería tisular. El objetivo de la ingeniería tisular es la construcción de tejidos biológicos artificiales y la utilización con fines médicos de los mismos para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de tejidos y órganos enfermos. La utilidad terapéutica de este tipo de técnicas es prácticamente ilimitada con aplicaciones en todos los campos. El empleo de las técnicas de ingeniería tisular permite disminuir las listas de espera de tejidos y órganos, con la consiguiente disminución de la morbi-mortalidad de la enfermedad en el receptor. Lógicamente, también tiene como consecuencia una disminución de la morbi-mortalidad en los donantes de órganos. Por otra parte, existen numerosas ventajas asociadas a la utilización de células o tejidos autólogos en la ingeniería tisular, destacando: (a) una reducción significativa del número de infecciones del donante al receptor por agentes infecciosos; y (b) la ausencia de rechazo inmune injerto contra huésped, por lo que el paciente no tiene necesidad de tomar tratamiento inmunosupresor, evitándose los efectos secundarios y los problemas asociados a la inmunodepresión.

Por tanto, un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

El tejido artificial de la invención puede emplearse para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de cualquier tejido u órgano enfermo o dañado de un organismo vivo. El tejido o el órgano pueden ser internos como, por ejemplo, pero sin limitarse, la uretra o la vejiga, o externos como, por ejemplo, pero sin limitarse, la córnea o la piel. En una realización preferida, el tejido o el órgano dañado se seleccionan de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa oral, conjuntiva, pared abdominal, conjuntiva, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina. El tejido o el órgano pueden estar enfermos o dañados como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad, por ejemplo, pero sin limitarse, una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa; un daño físico como un traumatismo o una intervención quirúrgica, un daño químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel. Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga. Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad selec-

cionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, una extrofia de cloaca o una microvejiga), una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra. Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, un hispospadias o un epispadias) o una estenosis.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea. Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límibica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento.

Dicho medicamento es un medicamento de terapia celular somática. Se entiende por "terapia celular somática" la utilización de células somáticas vivas, autólogas, alogénicas o xenogénicas, cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación, para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo, por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos. Entre los medicamentos de terapia celular somática se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse: células manipuladas para modificar sus propiedades inmunológicas, metabólicas o funcionales de otro tipo en aspectos cualitativos o cuantitativos; células clasificadas, seleccionadas y manipuladas, que se someten posteriormente a un proceso de fabricación con el fin de obtener el producto terminado; células manipuladas y combinadas con componentes no celulares (por ejemplo, matrices o productos sanitarios biológicos o inertes) que ejercen la acción pretendida en principio en el producto acabado; derivados de células autólogas expresadas *ex vivo* (*in vitro*) en condiciones específicas de cultivo; o células modificadas genéticamente o sometidas a otro tipo de manipulación para expresar propiedades funcionales homologas o no homologas anteriormente no expresadas.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano. En una realización preferida, el tejido o el órgano dañado se seleccionan de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa oral, conjuntiva, pared abdominal, conjuntiva, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina.

Una realización preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado como consecuencia de una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal.

Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga. Una realización aún más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de

una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, una extrofia de cloaca o una microvejiga), una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra. Una realización aún más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, un hispospadias o un epispadias) o una estenosis.

Una realización más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea. Una realización aún más preferida de este quinto aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límibica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención.

Una realización preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para su uso en terapia celular somática.

Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano.

Una realización preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado como consecuencia de una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, una extrofia de cloaca o una microvejiga), una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, un hispospadias o un epispadias) o una estenosis.

Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada

de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límibica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención, y además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención, y además, otro principio activo. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención y, además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "substancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra un esquema del procedimiento empleado para la nanoestructuración del tejido artificial.

Figura 2. Muestra la evaluación de los productos de mucosa oral humana artificial. A. Análisis mediante el microscópico óptico de los tejidos de fibrina, agarosa y colágeno (este último a una concentración final de 2,8 g/L) teñidos con hematoxilina y eosina tras 1, 2, 3 y 4 semanas de desarrollo en cultivo y del estroma de la mucosa oral humana utilizada como control. B. Análisis mediante el microscopio electrónico de barrido de los tejidos artificiales basados en fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final preferida de colágeno de 2,8 g/L (A) en comparación con los tejidos artificiales de fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final de colágeno de 3,8 g/L (B), de fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final de colágeno de 1,9 g/L (C), o de colágeno a una concentración final de 5,6 g/L en ausencia de fibrina y agarosa (D) y del estroma de la mucosa oral humana normal utilizada como control (E). C. Esfuerzo umbral de los tejidos artificiales basados en fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final preferida de colágeno de 2,8 g/L (A) en comparación con los tejidos artificiales de fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final de colágeno de 3,8 g/L (B), de fibrina, agarosa y colágeno con una concentración final de colágeno de 1,9 g/L (C), o de colágeno a una concentración final de 5,6 g/L en ausencia de fibrina y agarosa (D).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Elaboración de productos artificiales mediante biomateriales de fibrina, agarosa y colágeno

Protocolo de elaboración de los productos de mucosa oral humana artificial

A. *Generación de cultivos primarios de células epiteliales y estromales*

Para establecer cultivos primarios de células epiteliales (células epiteliales de la mucosa oral) y estromales (fibroblastos), se utilizan biopsias de mucosa oral normal procedente de donantes humanos o de animales de laboratorio, utilizando los siguientes métodos y protocolos:

- Obtención de una biopsia de la mucosa oral y transporte al laboratorio en suero fisiológico estéril.

- Aislamiento y cultivo de células epiteliales y estromales utilizando técnicas estándar de digestión enzimática (tripsina o dispasa para aislamiento epitelial y colagenasa para el estroma) o de explante tisular.

- Cultivo en medios específicos para células epiteliales o estromales hasta alcanzar la confluencia celular.

Todos los cultivos se mantienen en un incubador a 37ºC con un 5% de CO_2 en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células alcanzan la confluencia en cultivo.

B. *Construcción en laboratorio de los sustitutos tisulares de fibrina, agarosa y colágeno mediante ingeniería tisular*

1- Generación de sustitutos del estroma tisular con células estromales inmersas en su espesor. Para preparar 20 ml de sustituto estromal:

a.-Preparar 10 ml de colágeno tipo I líquido tomando un volumen de colágeno líquido concentrado a 6,4 mg/ml de 8,81 ml. Añadir 1,1 ml de PBS 10X y ajustar el pH a 7,4±0,2 mediante la adición de aproximadamente 90 μL de NaOH. Para elevar el pH se suele emplear NaOH a una concentración de entre 0,1 y 1 M, aunque también pueden emplearse otros productos. Mezclar mediante agitación suave y mantener en hielo para evitar la gelificación prematura.

b.- Preparar 10 ml de una mezcla de fibrina y agarosa procediendo del siguiente modo:

- Obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donación (posibilidad de origen autólogo).
- Adición de 150.000 células estromales previamente cultivadas y resuspendidas en 750 μl de medio de cultivo DMEM.
- Adición de 150 μl de ácido tranexámico para evitar la fibrinolisis del gel de fibrina.
- Adición de 1 ml de ClCa2 al 1% para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.
- Adición rápida de 0,5 ml de agarosa tipo VII al 2% disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave mediante agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1%. El rango de concentraciones de agarosa que permite productos de mucosa oral viables oscila entre y 0,025% y 0,3% y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

c.- Mezclar ambas soluciones (de colágeno y de fibrina-agarosa) en proporción variable en dependencia del producto que se quiera generar. En todos los casos, mezclar lo más rápidamente posible ambas soluciones, manteniendo la solución de colágeno en frío hasta el momento exacto de la mezcla.

- Para generar el producto A (2,8 g/L de colágeno, 1,25 g/L de fibrina y 0,5 g/L de agarosa), añadir 10 ml de la solución de colágeno y 10 ml de la solución de fibrina-agarosa.
- Para generar el producto B (3,8 g/L de colágeno, 0,6 g/L de fibrina y 0,25 g/L de agarosa), añadir 15 ml de la solución de colágeno y 5 ml de la solución de fibrina-agarosa.
- Para generar el producto C (1,9 g/L de colágeno, 1,9 g/L de fibrina y 0,75 g/L de agarosa), añadir 5 ml de la solución de colágeno y 15 ml de la solución de fibrina-agarosa.

d.- Alicuotar lo antes posible en insertos porosos de cultivo celular o en placas de Petri estériles.

e.- Dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min en incubador a 37ºC.

2- Desarrollo de una capa de epitelio en la superficie del sustituto estromal mediante subcultivo de las células epiteliales de la mucosa oral sobre el sustituto estromal. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.

3- Mantener en incubador a 37ºC con un 5% de CO_2 en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto estromal (alrededor de una semana).

4- Exponer la superficie epitelial al aire (técnica aire líquido) manteniendo el sustituto estromal sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración del epitelio (alrededor de una semana).

5- Extraer el tejido artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositando el mismo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol 70% sobre la superficie del sustituto estromal para evitar que la capa epitelial del sustituto tisular se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro

estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto estromal cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1) Todo el proceso se ha de llevar a cabo en campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

6- Una vez deshidratado el tejido, cortarlo a medida dándole la forma deseada, utilizando hilo de sutura quirúrgica monofilamento. Hemos de destacar que el deshidratado del tejido resulta en adecuados niveles de consistencia y elasticidad, permitiendo llevar a cabo la sutura sin ninguna dificultad.

C. *Construcción en laboratorio de los sustitutos tisulares de colágeno mediante ingeniería tisular*

1- Generación de sustitutos del estroma tisular con células estromales inmersas en su espesor. Para preparar 20 ml de sustituto estromal:

- Tomar 17,62 ml de colágeno líquido concentrado a 6,4 mg/ml; añadir 1,45 ml de PBS 10X y ajustar el pH a 7,4±0,2 mediante la adición de aproximadamente 180 μL de NaOH. Para elevar el pH se suele emplear NaOH a una concentración de entre 0,1 y 1 M, aunque también pueden emplearse otros productos. Mezclar mediante agitación suave y mantener en hielo para evitar la gelificación prematura.

- Adición de 150.000 células estromales previamente cultivadas y resuspendidas en 750 μl de medio de cultivo DMEM.

- Alicuotar lo antes posible en insertos porosos de cultivo celular o en placas de Petri estériles.

- Dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min en incubador a 37ºC.

2- Desarrollo de una capa de epitelio en la superficie del sustituto estromal mediante subcultivo de las células epiteliales de la mucosa oral sobre el sustituto estromal. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.

3- Mantener en incubador a 37ºC con un 5% de CO_2 en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto estromal (alrededor de una semana).

4- Exponer la superficie epitelial al aire (técnica aire líquido) manteniendo el sustituto estromal sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración del epitelio (alrededor de una semana).

5- Extraer el tejido artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositando el mismo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol 70% sobre la superficie del sustituto estromal para evitar que la capa epitelial del sustituto tisular se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto estromal cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso se ha de llevar a cabo en campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

6- Una vez deshidratado el tejido, cortarlo a medida dándole la forma deseada, utilizando hilo de sutura quirúrgica monofilamento.

Evaluación de los productos de mucosa oral humana artificial (Figura 2)

Se llevó a cabo la evaluación de los productos obtenidos según el protocolo anterior. Las concentraciones de fibrina, agarosa y colágeno para cada uno de los productos elaborados se indican a continuación:

A.- fibrina (1,25 g/L), agarosa (0,5 g/L) y colágeno (2,8 g/L).

B.- fibrina (0,6 g/L), agarosa (0,25 g/L) y colágeno (3,8 g/L).

C.- fibrina (1,9 g/L), agarosa (0,75 g/L) y colágeno (1,9 g/L).

D.- fibrina (0 g/L), agarosa (0 g/L) y colágeno (5,6 g/L).

1) *Análisis microscópico de los tejidos artificiales (control de calidad histológico) (Figura 2A)*

El análisis microscópico reveló que los tejidos artificiales generados mediante ingeniería tisular presentaban analogía estructural con los tejidos nativos utilizados como control. En concreto, se pudo apreciar un estroma compuesto

por numerosas fibras entre las que se disponían las células estromales, mostrando adecuados niveles de proliferación celular. En comparación con otros modelos previamente descritos (especialmente, los modelos de fibrina y de fibrina con agarosa), los tejidos de fibrina, agarosa y colágeno presentan mayor densidad fibrilar a nivel del estroma. Todo ello sugiere que los productos tisulares construidos en base al protocolo arriba expuesto, son compatibles con los tejidos humanos nativos normales.

2) *Control de calidad reológico (Figura 2B)*

El análisis de las propiedades biomecánicas de los productos tisulares construidos en base al protocolo arriba expuesto mediante un reómetro. Los resultados se muestran en la figura 2C y revelan que el mejor tejido es el producto A seguido del C, siendo el B muy similar al D (colágeno sólo). Por tanto, el análisis realizado demostró una mejora del comportamiento viscoelástico y un esfuerzo umbral creciente según se aumenta la concentración de colágeno, y más elevado que el mostrado por los tejidos artificiales de colágeno.

Los datos presentados en estos ejemplos muestran que las propiedades físicas de los tejidos de fibrina, agarosa y colágeno son óptimas y similares a las de los tejidos humanos normales utilizados como control, lo que supone una mejora con respecto a los tejidos artificiales descritos con respecto a su utilización clínica.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* de preparación de un tejido artificial que comprende:

a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a una muestra de células aisladas,

b) añadir un agente antifibrinolítico al producto resultante del paso (a),

c) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante del paso (b),

d) añadir una composición de un polisacárido al producto resultante del paso (c),

e) añadir una composición que comprende una proteína tipo colágeno al producto resultante del paso (d),

f) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante del paso (e), y

g) inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (f).

2. Método según la reivindicación 1 donde la proteína añadida en el paso (e) es colágeno.

3. Método según la reivindicación 2 donde el colágeno es colágeno tipo I.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la inducción de la nanoestructuración del paso (g) comprende la deshidratación y/o la compresión mecánica del producto resultante del paso (f).

5. Método según la reivindicación 4 donde la deshidratación del producto resultante del paso (f) comprende un procedimiento seleccionado de la lista que comprende: drenaje, evaporación, succión, presión capilar, ósmosis o electroósmosis.

6. Método según la reivindicación 5 donde la deshidratación del producto resultante del paso (f) mediante presión capilar comprende la aplicación de un material absorbente sobre el producto resultante del paso (f).

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 donde la compresión mecánica del paso (g) comprende un procedimiento seleccionado de la lista que comprende: aplicación de una carga estática, aplicación de u hidráulico, aplicación de una leva, aplicación de uno o más rodillos, aplicación de un globo, extrusión o centrifugación.

8. Método según la reivindicación 7 donde la aplicación de una carga estática del paso (g) comprende la colocación de un peso sobre el producto resultante del paso (f).

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que además comprende un paso entre el paso (b) y el paso (c) en el que se añade una proteína.

10. Método según la reivindicación 9 donde la proteína añadida entre el paso (b) y el paso (c) es fibronectina.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde entre el paso (f) y el paso (g) hay un paso adicional en el que el producto resultante del paso (f) se expone al aire.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la composición que contiene fibrinógeno del paso (a) es plasma sanguíneo.

13. Método según la reivindicación 12 donde el plasma sanguíneo es de origen autólogo.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde el agente antifibrinolítico del paso (b) es ácido tranexámico.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 donde la fuente de calcio del paso (c) es una sal de calcio.

16. Método según la reivindicación 15 donde la sal de calcio del paso (c) es cloruro cálcico.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 donde el polisacárido del paso (d) es agarosa.

18. Método según la reivindicación 17 donde la agarosa es de tipo VII.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde las células del paso (a) son fibroblastos.

20. Método según la reivindicación 19 donde los fibroblastos proceden del estroma de un tejido o un órgano seleccionado de la lista que comprende: mucosa oral, vejiga, o uretra.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 donde las células del paso (f) comprenden células epiteliales.

22. Método según la reivindicación 21 donde las células epiteliales del paso (f) se seleccionan de la lista que comprende: células del urotelio, células del epitelio de la uretra, o células del epitelio de la mucosa oral.

23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 donde las células del paso (a) y/o las células del paso (f) son de origen autólogo.

24.Tejido artificial obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

25. Uso del tejido artificial según la reivindicación 24 para la evaluación de un producto farmacológico y/o químico.

26. Uso del tejido artificial según la reivindicación 24 para la elaboración de un medicamento.

27. Uso del tejido artificial según la reivindicación 26 para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

28. Uso del tejido artificial según la reivindicación 27 donde el tejido o el órgano dañado se selecciona de la lista que comprende: vejiga, uretra o mucosa oral.

29. Uso del tejido artificial según la reivindicación 28 para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal.

30. Uso del producto de tejido artificial según la reivindicación 28 donde la vejiga está enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita, una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

31. Uso del producto de tejido artificial según la reivindicación 28 donde la uretra está enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita o una estenosis.

32. Composición farmacéutica que comprende el tejido artificial según la reivindicación 24.

33. Composición farmacéutica según la reivindicación 32 que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

34. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 32 ó 33 que comprende, además, otro principio activo.

VIDRIO
PAPEL DE FILTRO
TELA DE NYLON
TEJIDO ARTIFICIAL
PAPEL DE FILTRO
VIDRIO

FIG.1

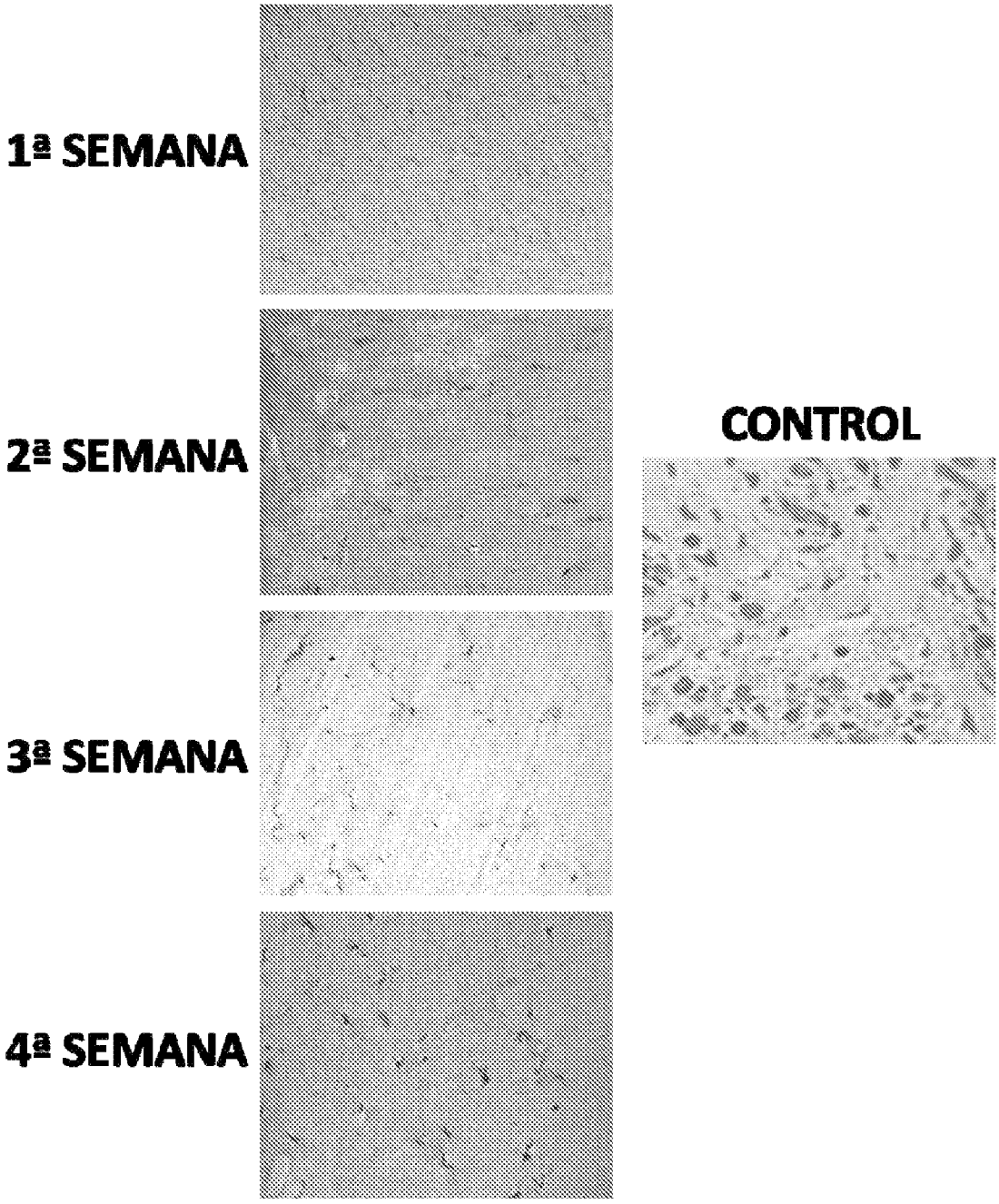


FIG.2A

FIG. 2B

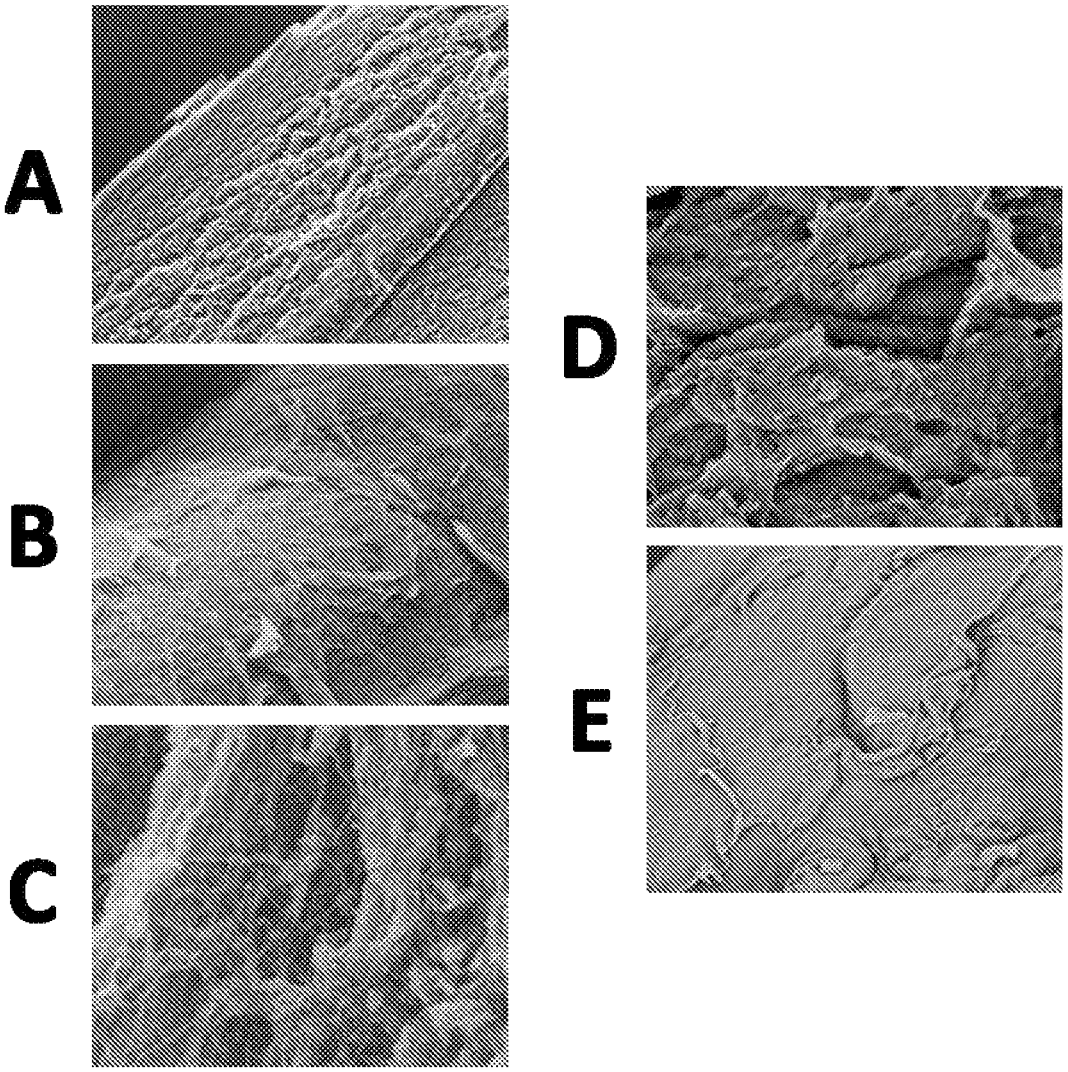
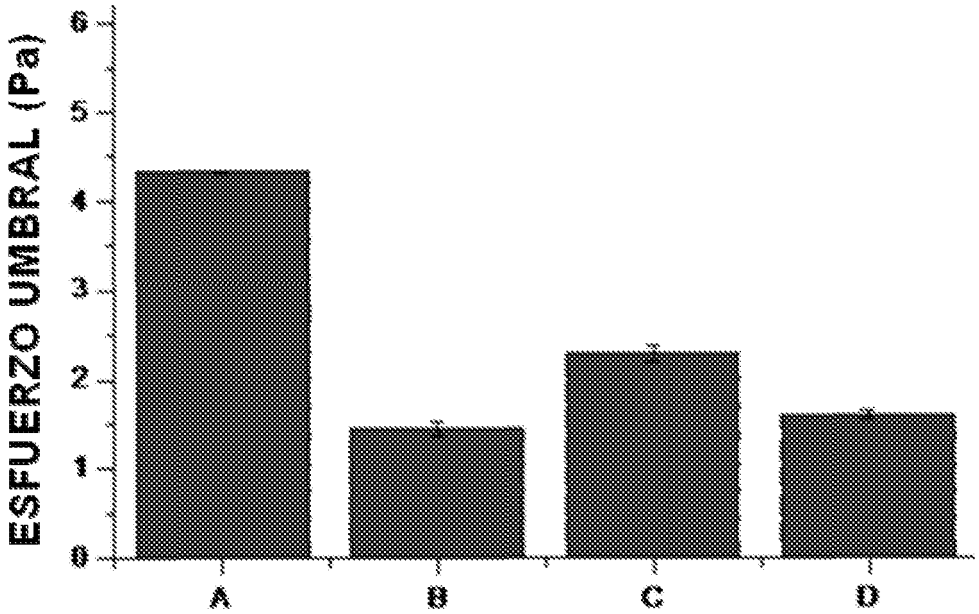


FIG.2C



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 200930943

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 02.11.2009

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	SANCHEZ-QUEVEDO, M. C., *et al*. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. Histology and histopathology. Junio 2007. Vol. 22, nº 6, páginas 631-640. ISSN 1699-5848 (Electrónico). Ver todo el documento, especialmente los apartados 4 y 5 de Materiales y Métodos y apartados 1 y 2 de Resultados.	1-3
A		4-34
Y	SHIH YU-RU, V., *et al.* Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. Stem cells (Dayton, Ohio). Noviembre 2006. Vol. 24, nº 11, páginas 2391-2397. ISSN 1066-5099. Ver todo el documento, especialmente el apartado Materiales y Métodos.	1-3
A		4-34
A	PERKA, C., *et al.* Joint cartilage repair with transplantation of embryonic chondrocytes embedded in collagen-fibrin matrices. Clinical and experimental rheumatology. Enero 2000. Vol. 18, nº 1, páginas 13-22. ISSN 0392-856X. Ver todo el documento, especialmente el apartado Materiales y Métodos.	1-34

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
14.06.2011	B. Pérez Esteban	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/38 (2006.01)
C12N5/071 (2010.01)
A61K35/12 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, C12N, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.06.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-34	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	4-34	**SI**
	Reivindicaciones	1-3	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SANCHEZ-QUEVEDO, M. C., *et al*. Histology and histopathology. Junio 2007. Vol. 22, nº 6, páginas 631-640. ISSN 1699-5848 (Electrónico).	Junio 2007
D02	SHIH YU-RU, V., *et al.* Stem cells (Dayton, Ohio). Noviembre 2006. Vol. 24, nº 11, páginas 2391-2397. ISSN 1066-5099.	Noviembre 2006
D03	PERKA, C., *et al.* Clinical and experimental rheumatology. Enero 2000. Vol. 18, nº 1, páginas 13-22. ISSN 0392-856X.	Enero 2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe un método in vitro para preparar un tejido artificial (mucosa oral, vejiga o uretra). El método consiste en mezclar una muestra de células aisladas (fibroblastos) con una composición que contiene fibrinógeno (concretamente plasma sanguíneo), un agente antifibrinolítico (ácido tranexámico), un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, un polisacárido (agarosa) y colágeno. Sobre esta preparación se crecen células aisladas (células epiteliales) y se induce la nanoestructuración del producto obtenido. La solicitud reivindica, además del método, el tejido artificial obtenible por dicho método, el uso del mismo para la elaboración de un medicamento, y la composición farmacéutica que contiene el mencionado tejido.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el método tal y como está reivindicado, ni el tejido obtenido, ni su uso, por lo que la solicitud es nueva según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Sin embargo, como se explica a continuación, se han encontrado algunos documentos cuya combinación, obvia para el experto en la materia, afectaría la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud, por lo que estas reivindicaciones no cumplirían el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se obtiene tejido artificial de mucosa oral por ingeniería de tejidos. En el procedimiento empleado en D01 se cultivan fibroblastos en un gel de fibrina y agarosa, como en la solicitud. Igual que es ésta, el gel se obtiene al mezclar muestras de plasma (que contiene el fibrinógeno y los factores de coagulación) con ácido tranexámico, cloruro cálcico (para conseguir la polimerización de la fibrina), y agarosa tipo VII. Sobre la matriz resultante se cultivan células epiteliales, y el producto resultante se expone al aire durante 2 semanas más para favorecer la estratificación del tejido obtenido.

La diferencia entre el método de la solicitud y el divulgado en D01 es la adición de colágeno y la nanoestructuración del producto final.

En el documento D02 se describe una matriz útil en ingeniería de tejidos compuesta por nanofibras de colágeno tipo I. En esta matriz se cultivan células madre mesenquimales y se diferencian a tejido óseo.

Se considera que el experto en la materia combinaría de forma evidente la información divulgada en los documentos D01 y D02 y llegaría de este modo al método de las reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud. Por consiguiente, estas reivindicaciones no cumplen el requisito de actividad inventiva.

Estos documentos no afectan la novedad ni la actividad inventiva de las demás reivindicaciones de la solicitud, pues en ellos no se menciona la adición de fibronectina para construir la matriz, y el método de nanoestructuración de D02 no coincide con ninguno de los reivindicados.

El documento D03 describe el uso de matrices de colágeno y fibrina para crecer condrocitos y generar tejido cartilaginoso, útil en la reparación de articulaciones. Puesto que las matrices no contienen agarosa ni fibronectina, ni se incluyen pasos de nanoestructuración en el procedimiento de preparación de la matriz, este documento no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.